第20卷第1期
1996年3月

水 产 学 报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

Vol.20, No.1
March, 1996

应用 Dot－ELISA 技术检测草鱼出血病病毒的研究

邵健忠 项黎新 李亚南 毛树坚
(杭州大学，310012)

摘 要 报道了斑点免疫吸附 ELISA(Dot-ELISA)快速检测草鱼出血病病毒(GCHV)的方法以及对提纯病毒、染毒细胞内病毒和病鱼组织的检测结果，并对该方法的灵敏度与 SPA-CoA 和常规 ELISA 法进行了系统的比较。结果表明，Dot-ELISA 检出 GCHV 的最低含量为 3pg，该灵敏度比 SPA-CoA 和常规 ELISA 法分别提高 10 倍和 20 倍，而且快速易行，是目前检测 GCHV 最为有效的方法，并可在草鱼出血病临床诊断和病毒疫苗质量鉴定等方面得到应用。

关键词 斑点酶联免疫吸附试验，草鱼出血病病毒，草鱼出血病，鱼病诊断

斑点免疫吸附 ELISA(Dot-ELISA) 是近年建立的一种新的免疫检测技术，具有操作简便、灵敏度高等优点而在动植物病毒检测中得到广泛应用[Bode 等，1984；Hibi 等，1985]。草鱼出血病病毒(Grass Carp Haemorrhagic Virus, GCHV)是草鱼出血病的病原，是呼肠孤病毒科(Reoviridae)的一个新成员[柯丽华等，1990]。建立快速灵敏的检测技术是深入开展病毒血清学分析以及草鱼出血病诊断和防治的重要内容。目前有关 GCHV 免疫检测技术的研究主要见诸常规酶联免疫吸附试验(ELISA)和葡萄球菌 A 蛋白协同凝集试验(SPA-CoA) 等方法[闵淑琴等，1986；杨广智等，1991]，尚未见 Dot-ELISA 的研究报道。本文阐述 GCHV 的 Dot-ELISA 检测方法与应用及其与常规 ELISA 和 SPA-CoA 的比较结果。

1 材料与方法

1.1 GCHV 毒种来源及分离纯化

GCHV 毒种分别取自浙江省湖州和杭州疫区自然发病的出血病病鱼组织，用蔗糖密度梯度离心法分离纯化，电镜及紫外分光光度吸收法测定纯度，并按 Farrel 等[1974]的 $9.1OD_{260nm}=1mg/ml$ 测定病毒含量。

1.2 兔 GCHV 抗血清的制备及 IgG 的分离纯化

参照闵淑琴等[1986]方法免疫大白兔，琼脂双向扩散法测定抗血清效价，待滴度达到 1:256 左右，从颈动脉采血制备血清，经 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀后用 DEAE-SephadexA50 柱层析法提纯 IgG，紫外分光光度法测定含量。

1.3 鼠 GCHV 抗血清的制备

按常规腹腔注射法免疫 BALB/C 鼠，待效价达到 1:32 以上，从眼眶采血制备血清，经

收稿日期：1995－03－07。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.

$(NH_4)_2SO_4$ 沉淀部分提纯后备用。

1.4　被检病鱼组织材料的制备

取肝脏、肾脏、脾脏、肠道和肌肉等病变组织,经匀浆、离心等处理后加 PBS 制成 10%浓度的组织液供作检测。

1.5　被检染毒细胞材料的制备

将提纯的 GCHV 接种于生长至单层的草鱼 ZC7901 吻端组织细胞系,吸附 2h 后洗去剩余病毒,加入含 1%胎牛血清的 199 培养液。然后每隔 12h 观察一次细胞病变效应,并取一次上清液样品,将其中 1/2 样品用于免疫检测,另 1/2 样品用于病毒毒力 $TCID_{50}$值测定。

1.6　Dot-ELISA 测定

参照 Berger 等[1985]方法进行。将孔径 0.22 微米的硝酸纤维素膜(NCM,Amersham 公司产品)依次浸入去离子水和 TBS(0.01mol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.9%NaCl)溶液各 5 分钟,然后置于带抽滤设备的点样器上,抽滤点样。被检样品用 PBS 倍比稀释,每样品点 25 μl,37℃干燥 1h 后用 TBS 配制的 5% BSA 封膜 15 分钟,然后转入终浓度 5～10 μg/ml 的兔抗 GCHV IgG 中,37℃孵育 1h,用 TBS 配制的 0.05% NP-40 洗涤 3 次,每次 5 分钟,然后再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(GAR-HRP,华美生物工程公司产品,工作浓度 1:1000)或辣根过氧化物酶标记的 A 蛋白(SPA-HRP,上海生物制品所产品,工作浓度 1:40),37℃作用 1h,如上洗涤 3 次后加底物溶液(0.6% DAB, 用 0.05mol/L Tris-HCl, pH 7.6 配制, 用之前加 H_2O_2 至终浓度 0.01%), 室温下显色。以上操作可用一完整的 NCM 在一平皿内进行,也可用打孔器将 NCM 打成直径 4mm 的小孔片,然后置微孔测定板内进行,检测中同时设正常鱼组织和细胞提取物及空白 PBS 等作对照。阳性结果呈鲜艳的棕褐色斑点,阴性对照为无色。

1.7　SPA-CoA 试验

参照杨广智等[1991]方法进行。金黄色葡萄球菌 Cowan I 株经 LB 培养基扩增后,用 0.01 mol/LPB, pH 7.5 配成 10%(W/V)灭活菌体, 然后用兔抗 GCHV IgG 致敏。取致敏菌体和待测样品各 10μl 滴加在反应板上,混匀后观察凝集程度。另设对照同上。

1.8　ELISA 测定

按常规双抗体夹心法进行[江育林等,1990]。用鼠抗血清包被滴定板,然后依次加入待测样品、兔抗血清和 GAR-HRP,分别在 37℃作用 2h,PBS-Tween20 洗涤,最后用 DAB 显色,酶标仪测定 490nm 波长下样品孔(P) 和对照孔(N) 的光密度值,以 P/N≥2.1 定为阳性。

2　结果

2.1　提纯 GCHV 抗原的 Dot-ELISA 检测及与 SPA-CoA 和 ELISA 灵敏度比较

提纯的 GCHV 样品在电镜下呈大量均一的病毒颗粒(图 1),含量测定结果为 1.2mg/ml, Dot-ELISA 检测呈强阳性反应。进一步将样品作系列稀释以测定其检测灵敏度,结果表明

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.

Dot-ELISA 法比 SPA-CoA 和常规 ELISA 法有明显提高，其中采用 GAR-HRP 显色可检出的最低病毒量为 3pg，比 SPA-CoA 和 ELISA 法分别提高 10 倍和 20 倍，采用 SPA-HRP 显色可检出的最低病毒量为 6pg，比 SPA-CoA 和 ELISA 法分别提高 5 倍和 10 倍。对照的正常鱼组织分离物及空白 PBS 对照均呈阴性(图 2、表 1)。

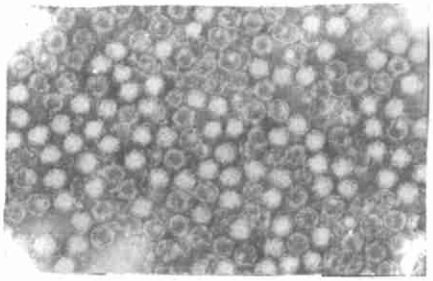

图 1 供 Dot-ELISA 检测的提纯 GCHV 的电镜观察(×100K)

Fig.1 Electron microphotograph of purified GCHV provided for Dot-ELISA, ×100K

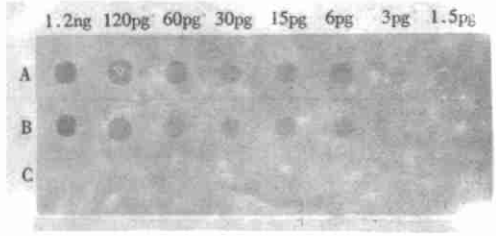

图 2 提纯 GCHV 的 Dot-ELISA 检测

Fig.2 Detection of purified GCHV by Dot-ELISA

A：GAR-HRP 显色； B：SPA-HRP 显色；

C：健康鱼组织提取物及空白 PBS 对照。

表 1 Dot-ELISA、SPA-CoA 和 ELISA 检测提纯 GCHV 灵敏度的比较

Table 1 Comparison of sensitivity among Dot-ELISA, SPA-CoA and ELISA with purified GCHV

病毒含量 (mg)	Dot-ELISA		SPA-CoA 试验	ELISA(P/N)
	GAR-HRP 显色	SPA-HRP 显色		
1.2×10^{-6}	++++	++++	+++	+(2.30)
1.2×10^{-7}	+++	+++	++	+(2.20)
0.6×10^{-7}	+++	++	+	+(2.12)
0.3×10^{-7}	++	++	+	-(1.98)
1.5×10^{-8}	++	+	-	-(1.54)
0.6×10^{-8}	+	+	-	-(1.10)
0.3×10^{-8}	+	-	-	-(1.00)
0.15×10^{-8}	-	-	-	-(0.98)

2.2 感染细胞中 GCHV 抗原的 Dot-ELISA 检测及与 SPA-CoA 和 ELISA 灵敏度比较

为了检验 Dot-ELISA 检测感染细胞中 GCHV 的灵敏度，将病毒接种于细胞后每隔 12h 取样，分别进行 Dot-ELISA 试验和 $TCID_{50}$测定。结果表明，当肉眼可见的细胞病变效应(CPE) 出现后，其上清液的 Dot-ELISA 检测结果呈强阳性反应，而在未出现 CPE 时仍可得到阳性结果，其中 GAR-HRP 显色法的阳性检出时间最早为病毒感染后 24h，比 SPA-CoA 和 ELISA 法提前 24h 出现阳性结果，此时的检测灵敏度为 $10^{2.2}TCID_{50}/0.1ml$，比 SPA-CoA 和 ELISA 法提高 15 倍。采用 SPA-HRP 显色的阳性检出时间为 36h，灵敏度为 $10^{2.6}TCID_{50}/0.1ml$，比 SPA-CoA 和 ELISA 法提前 12h 出现阳性，灵敏度提高 6 倍。未感染病毒的细胞液对照呈阴性(图 3、表 2)。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.

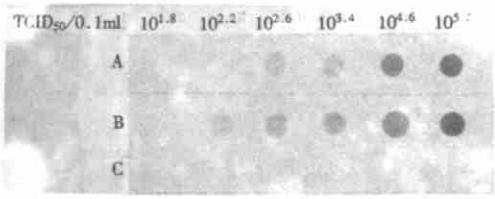

图 3　感染细胞(ZC7901)中 GCHV 的 Dot-ELISA 检测

Fig. 3　Detection of GCHV infected in ZC7901 cell line by Dot-ELISA

A:SPA-HRP 显色;　B:GAR-HRP 显色;

C:未感染的细胞上清液对照

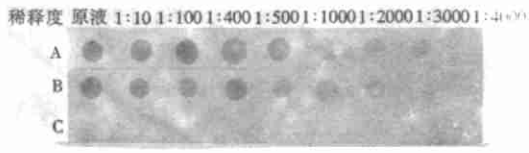

图 4　病鱼组织中 GCHV 的 Dot-ELISA 检测

Fig.4　Detection of GCHV infected in pathologic tissues by Dot-ELISA

A:GAR-HRP 显色;　B:SPA-HRP 显色;

C:健康鱼组织液对照

表 2　Dot-ELISA、SPA-CoA 和 ELISA 检测感染细胞中 GCHV 灵敏度的比较

Table 2　Comparison of sensitivity among Dot-ELISA, SPA-CoA and ELISA with GCHV in infected cells

感染时间 (h)	细胞病变 CPE(%)	病毒滴度 ($TCID_{50}$/0.1ml)	Dot－ELISA GAR-HRP 显色	Dot－ELISA SPA-HRP 显色	SPA-CoA	ELISA(P/N)
未感染	0	0	－	－	－	－(1.05)
12	0	$10^{1.8}$	－	－	－	－(1.00)
24	0	$10^{2.2}$	＋	－	－	－(1.20)
36	0	$10^{2.6}$	＋＋	＋	－	－(1.45)
48	25	$10^{3.4}$	＋＋	＋＋	＋	＋(2.12)
60	50	$10^{4.6}$	＋＋＋	＋＋＋	＋＋	＋(3.40)
72	75	$10^{5.2}$	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋	＋(3.46)

2.3　病鱼组织中 GCHV 抗原的 Dot-ELISA 检测及与 SPA-CoA 和 ELISA 灵敏度比较

病鱼组织提取液的 Dot-ELISA 检测反应也呈强阳性。其中 GAR-HRP 显色法可检出的最高组织液稀释度可达 1/3000,比 SPA-CoA 和 ELISA 法分别提高 6 倍和 7.5 倍,SPA-HRP 显色可达到的最高稀释度则为 1/2000,比 SPA-CoA 和 ELISA 法提高 4 倍和 5 倍。正常鱼组织液对照呈阴性(图 4,表 3)。

表 3　Dot-ELISA、SPA-CoA 和 ELISA 检测病鱼组织中 GCHV 灵敏度的比较

Table 3　Comparison of sensitivity among Dot-ELISA, SPA-CoA and ELISA with GCHV in pathological tissues

组织液稀释度	Dot-ELISA GAR-HRP 显色	Dot-ELISA SPA-HRP 显色	SPA-CoA	ELISA(P/N)
原液	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋(2.80)
1:10	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋	＋(2.62)
1:100	＋＋＋＋	＋＋＋	＋＋	＋(2.47)
1:400	＋＋＋	＋＋＋	＋	＋(2.23)
1:500	＋＋＋	＋＋	＋	－(1.94)
1:1000	＋＋	＋	－	－(1.72)
1:2000	＋	＋	－	－(1.50)
1:3000	＋	－	－	－(1.21)
1:3500	－	－	－	－(1.10)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.

2.4 病鱼中不同组织材料的 Dot-ELISA 检测

为了比较不同组织材料的检测效果，取肝脏、肾脏、脾脏、肠道和肌肉等病变组织分别作 Dot-ELISA 检测，然后比较各种组织的检测灵敏度，结果显示肾脏的灵敏度最高，其次分别为脾脏、肠道、肝脏和肌肉，说明前几种组织中 GCHV 含量高，是供 Dot-ELISA 检测的理想材料(表 4)。

表 4 5 种病鱼组织 Dot-ELISA 检测灵敏度的比较*

Table 4 Comparison of sensitivity among five tissues with Dot-ELISA

组织液稀释度	肝 脏	肾 脏	脾 脏	肠 道	肌 肉
原 液	+++	++++	++++	+++	++
1:10	+++	++++	++++	+++	++
1:100	++	++++	++++	++	+
1:500	++	+++	+++	++	+
1:1000	+	+++	++	+	-
1:2000	-	+++	++	+	-
1:3000	-	++	+	-	-
1:3500	-	+	-	-	-
1:4000	-	-	-	-	-

注：GAR-HRP 显色。

2.5 感染 GCHV 不显症草鱼的 Dot-ELISA 检测

为了观察 Dot-ELISA 对带毒不显症草鱼的检测效果，取健康一龄草鱼 72 尾，分为 6 个试验组和一个对照组，试验组分别注射感染 GCHV，然后置 25℃水温饲养，每隔 2 天检查感染鱼的发病症状，同时收集组织进行 Dot-ELISA 检测。结果表明，试验组鱼在感染 GCHV 的前 6 天内均未出现出血病症状，第 8 天开始部分鱼出现病症并死亡，第 12 天显症及死亡数达到高峰，而与之相对应的 Dot-ELISA 结果显示，试验组鱼在感染 GCHV 后的第 2 天即可出现 30%的阳性检出率，从第 6 天开始阳性率达 100%。对照组在试验期间未出现发病，检测结果均呈阴性。该试验表明 Dot-ELISA 技术对病毒感染早期带毒不显症的病鱼也有很好的检测效果，是草鱼出血病早期诊断的有效方法(表 5)。

表 5 感染 GCHV 不显症草鱼的 Dot-ELISA 检测

Table 5 Dot-ELISA for no symptom virus carrier

感染天数	第 2 天	第 4 天	第 6 天	第 8 天	第 10 天	第 12 天	对照组
试验鱼数(尾)	10	10	10	10	10	10	12
显症鱼数(尾)	0	0	0	4	8	10	0
病死鱼数(尾)	0	0	0	2	6	10	0
Dot-ELISA 阳性率(%)	30	80	100	100	100	100	0

3 讨论

(1)自 Banttari 和 Goodwin 以 NCM 为固相载体，应用双抗体夹心法检测了马铃薯 PVS、PVX

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.

和 PVY 病毒,并首次将此法命名为 Dot-ELISA 以来,该技术已在多种病毒检测中得到了应用[Banttari 等,1985]。与常规 ELISA 相比,Dot-ELISA 具有灵敏度高的显著优点,这是因为前者以聚苯乙烯塑料板作为固相载体,在与抗原抗体复合物的结合过程中存在明显的泄漏或解吸附现象。Salonen 等[1979]曾报道 IgG 在聚苯乙烯载体表面的吸附率只有加入量的 20.9%,到检测反应结束时,被吸附的 IgG 中又只有 50%～70%被最终保存下来,即在整个 ELISA 中,有效蛋白结合率只有 10%,因而大大降低了检测灵敏度。而 Dot-ELISA 以 NCM 为载体,对蛋白质有高度的亲和力,能比聚苯乙烯载体提供更为有效的结合表面,使抗体和抗原发生牢固结合,从而大大提高检测灵敏度。本研究表明应用 Dot-ELISA 检测 GCHV 确有很好的效果,其灵敏度比常规 ELISA 法提高 10～20 倍,比 SPA-CoA 法提高 5～10 倍,是目前 GCHV 检测中最为灵敏有效的方法。

(2)文中选用了病毒直接吸附的间接 Dot-ELISA 法,有报道认为它比双抗体夹心的直接法更为有效,原因是在间接法中首先吸附在 NCM 上的是病毒抗原,而每个病毒抗原表面有多个抗原决定簇,可以与相应数量的抗体分子结合,随后再结合同等数量的第二抗体分子。而直接法中首先吸附的是小分子抗体 IgG,在有限的吸附表面上即使吸附更多的 IgG,在随后和大颗粒病毒抗原结合时,由于空间的"位阻"效应,实际上结合上去的抗原数量却是有限的,这是间接法灵敏度高的一个原因[孟　清等,1993]。同时实验中采用了抽滤点样的方法,使病毒借助于外力的作用而驱使其全部加速吸附于 NCM 上,使有效抗原数量增加,灵敏度相应提高。此外,研究中还分别采用了 GAR-HRP 和 SPA-HRP 两种方法显色,结果表明前者的灵敏度约是后者的 2 倍。提示通过抗体——抗原作用原理而发生的 GAR 与 IgG 的结合效率比 SPA 与 IgG Fc 片段的结合效率高,从而使 GAR-HRP 的结合与显色更为有效。

(3)Dot-ELISA 检测 GCHV 的结果表明,该技术可作为草鱼出血病临床诊断和检疫以及出血病组织和细胞疫苗质量鉴定的一个灵敏而可靠的指标而应用于生产,同时与 SPA-CoA 和常规 ELISA 等检测方法相比较,Dot-ELISA 在结果判断上产生鲜明的色斑,与无色的 NCM 形成强烈对比,主观误差小,同时不需要特殊的酶标仪等,因此更适合于基层单位快速、准确和易行的检测需求。

参 考 文 献

[1] 江育林等,1990。用酶联免疫吸附试验快速检测虹鳟的传染性胰脏坏死病病毒。水生生物学报,**14**(3):276～279。

[2] 闵淑琴等,1986。鱼呼肠孤病毒(FRV)抗血清的制备及其应用。水产学报,**10**(4):383～387。

[3] 杨广智等,1991。葡萄球菌 A 蛋白协同凝集试验快速检测草鱼出血病病毒。水产学报,**15**(1):27～33。

[4] 孟　清等,1993。应用 Dot-ELISA 检测 PVX、PVY 和 PVS。中国病毒学,**8**(4):366～372。

[5] 柯丽华等,1990。一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性。水生生物学报,**14**(2):153～159。

[6] Banttari, E. E. *et al*., 1985. Detection of potato viruses S, X and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membrances (Dot-ELISA). *Plant Dis*., **69**:202～205.

[7] Berger, P.H. *et al*., 1985. Detection of picogram quantities of potyviruses using a Dot blot immunobinding assay. *J. Virol. Methods*, **12**:31～39.

[8] Bode, L. *et al*., 1984. Nitrocellulose enzyme-linked immunosorbent assay－a sensitive technique for the rapid visual detection of both viral antigens and antibodies. *J. Virol. Methods*, **8**:111～121.

[9] Farrel, J. A. *et al*., 1974. Biophysical studies of reovirus type 3.1. The molecular weights of reovirus and reovirus cores. *Virology*, **62**(1):145～153.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.

[10] Hibi, T. *et al*., 1985. A dot-immunobinding assay for the detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. *J. Gen. Virol*., **66** (5): 1191 ~ 1194.

[11] Salonen, E. *et al*., 1979. Immobilization of viral and mycoplasma antigens and of immunoglobulins on polystyrene surface for immunoassays. *J. Immunol. Methods*, **30**(3): 209 ~ 218.

STUDIES ON THE DETECTION OF GRASS CARP HAEMORRHAGIC VIRUS BY ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY ON NITROCELLULOSE MEMBRANCE(DOT - ELISA)

Shao Jianzhong, Xiang Lixin, Li Yanan and Mao Shujian

(*Hangzhou University*, 310012)

ABSTRACT The present study described a new technique of rapid detection for Grass Carp Haemorrhagic Virus (GCHV) with enzyme - linked immunosorbent assay on nitrocellulose membrance (Dot-ELISA). The viruses, which existed in purified preparations as well as in extracts of infected cells and tissues, were detected respectively by the technique. Mean while, the sensitivity of the technique was estimated and the results showed that the smallest ammount to detect the purified virus was as little as 3 Pg. In comparison with SPA coagglutination (SPA-CoA) test and ELISA, the sensitivity of Dot-ELISA was at least ten times higher than that of SPA-CoA and twenty times than that of ELISA. Moreover, the test was rapid and easy to operate. It was indicated that the Dot-ELISA was the most valuable technique for the detection of GCHV at the present and could be further used in the diagnosis for haemorragic disease of Grass Carp and the quality identification in the viral vaccinne production.

KEYWORDS Dot-ELISA, grass carp haemorrhagic virus, haemorrhage of grass carp, fish disease diagnosis

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.